Aus dem Pathologischen Institut am
Städtischen Krankenhaus Berlin - Moabit
Leiter: Professor Dr.med.Karlferdinand KLOOS

Über das fibrinolytische Potential von Plazentagewebe

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Benvenuto LIBAL
aus Tausa (Thüringen)

1961

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

Dissertations - Druckstelle

Berlin-Dahlem, Garystr. 45, Tel.: 76 52 61, App. 668

Aus dem Pathologischen Institut am
Städtischen Krankenhaus Berlin - Moabit
Leiter: Professor Dr.med.Karlferdinand KLOOS

Über das fibrinolytische Potential von Plazentagewebe

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Benvenuto LIBAL
aus Tausa (Thüringen)

Dekan: Professor Dr. med. Helmut SELBACH
Referent: Professor Dr. med. Karlferdinand KLOOS
Korreferent: Professor Dr. med. Herbert LAX

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.
Promoviert am: 7. August 1961

Inhaltsübersicht

I. Einleitung

a) Zur Geschichte der Fibrinolyseforschung
b) Aufgabenstellung dieser Arbeit

II. Die experimentelle Fibrinolyse

a) Definition

1.) Das fibrinolytische System
2.) die experimentelle Fibrinolyse

b) Reagenzien und Methodik

1.) Veronalpuffer
2.) Fibrinogen
3.) Thrombin
4.) Streptokinase-Streptodornase
5.) Vorbereitung der Geräte
6.) Herstellung der Fibrinplatten

aa) Die Fibrin-Profibrinolysin-Platte
bb) Die Fibrin- oder "Hitze"-Platte

7.) Das Aufbewahren der Fibrinplatten
8.) Das Aufbewahren des Gewebes
9.) Die Praeparation des Plazentagewebes

aa) Gewebswürfel (gespült, ungespült)
bb) Gewebshomogenate

c) Untersuchungen zur Bestimmung des fibrinolytischen Potentials verschiedener Gewebe

1.) Rattengewebe und Meerschweinchengewebe
2.) Gewebe ohne Streptokinase-Streptodornase-Aktivierung
3.) Streptokinase-Streptodornase-Lösung ohne Gewebe

d) Untersuchungen zur Bestimmung des fibrinolytischen Potentials von menschlichen Plazenten

1.) Belegen der Fibrinplatten
2.) Die Aktivierung des Gewebes

3.) Die Inkubation der Testplatten
4.) Das Messen der Lysiszonen
5.) Ergebnisse

III. Diskussion

a) Erörterung der Methode
b) Erörterung der Ergebnisse

IV. Zusammenfassung

V. Literaturverzeichnis

VI. Nachwort

VII. Lebenslauf

Einleitung

a) Zur Geschichte der Fibrinolyseforschung

MORGAGNI beschrieb im Jahre 1771 als erster, dass bei plötzlichen Todesfällen das Blut in der Leiche flüssig war. Dieser Befund wurde einige Jahre später von John HUNTER bestätigt. Darüber hinaus hat HUNTER berichtet, dass auch das Blut von Verstorbenen nach "Blitzschlag", nach "Anfällen", nach "seelischen Erregungszuständen", nach "Schlag auf den Magen" und "gelegentlich bei Erhängten" nicht geronnen war.
1838 wies DENIS nach, dass geronnenes Blut Fibrin aufzulösen vermag. Er brachte unter aseptischen Bedingungen Fibringerinnsel mit Serum für die Dauer von 18 Stunden bei 37°C in den Inkubator. Nach dieser Zeit war das Gerinnsel verflüssigt, im Reagensglas fanden sich als Spaltprodukte Proteosen und Peptone. Das Verschwinden von Humanfibrin in Salzlösung nach 12 bis 24 stündiger Inkubation wurde 1846 von ZIMMERMANN beobachtet. GREEN, der 1887 ähnliche Versuche durchführte, stellte fest, dass aufgelöstes Fibrin trotz Zugabe von Thrombin nicht mehr gerinnen kann. Er sprach von "defibriniertem Blut".

1893 veröffentlichte DASTRE, ein Schüler von Claude BERNARD, seine Studien des Fibrinolysevorganges an Hunden. Er hatte gefunden, dass das Blut von Hunden nach einem Aderlass fibrinolytisch aktiv war. DASTRE hat den Terminus Fibrinolyse geprägt. Ebenfalls im Jahre 1893 wurde durch eine Arbeit von HILDEBRANDT bekannt, dass im Blutplasma grosse Mengen von Proteolyse-Inhibitoren vorhanden sind. Damit dürfte erstmalig angedeutet worden sein, dass es sich bei der Fibrinolyse um einen durch antagonistische Ele-

mente geregelten Vorgang handelt.
Zu Anfang dieses Jahrhunderts gelang es HEDIN, den Fermentcharakter der Fibrinolyse nachzuweisen. NOLF nahm an, dass dieses Ferment dem Trypsin verwandt sei. Er glaubte irrtümlich, die Fibrinolyse sei nur eine Fortsetzung des Gerinnungsvorganges und müsse der fortgeschrittenen Thrombinwirkung zugeschriben werden. Im Jahre 1905 hat NOLF über die experimentelle Aktivierung des fibrinolytischen Systems bei Hunden durch Hepatektomie und Peptonschock berichtet. Er sah in diesem Ergebnis einen Beweis für die Beteiligung eines proteolytischen Enzymes an der Blutgerinnung, von der er glaubte, die Fibrinolyse sei ihre "logische", jedoch"ungewöhnliche" Folge.
Während CORIN und ANSIAUX bereits eine Ungerinnbarkeit des Blutes nach Phosphorvergiftung beschrieben hatten - was sie aber auf eine Fibrinogenolyse zurückführten - zeigte JACOBY, dass das Blut von phosphorvergifteten Tieren, mit normalem Blut gemischt, zunächst spontan und komplett gerinnt, dass sich jedoch diese Mischung schon nach wenigen Stunden vollständig verflüssigt (zit.nach HALSE, Th.). RULOT glaubte, dass bei der Auflösung des Fibrins Leukozyten beteiligt sind.
ROSENMANN konnte hingegen den Nachweis führen, dass auch leukozytenfreies Fibrin der Lysis verfällt. Heute gilt es als bewiesen, dass die Fibrinolyse grundsätzlich unabhängig von zellulärer Beteiligung ist.
Den experimentellen Studien folgten bald klinische und pathologisch-anatomische Beobachtungen, aus denen auf ein beträchtliches fibrinolytisches Poten-

tial in den Körperflüssigkeiten (Blut, Lymphe, Bronchialsekret, Speichel, Muttermilch, Urin) zu schliessen war.
DE LEE beschrieb 1901 eine als Folge der Geburt plötzlich begonnene hämorrhagische Diathese bei einer Patientin mit vorzeitiger Plazentalösung.
1906 berichtete MORAWITZ, dass das Blut bei plötzlichem Tode unmittelbar nach dessem Eintrit zwar gerinnt, sich aber anschliessend wieder rasch verflüssigt. Er stellte fest, dass das Blut solcher Leichen kein Fibrinogen enthält, und dass es in der Lage ist, Fibrinogen und Fibrin von normalem Blut zu zerstören. Während schon - wie oben ausgeführt - MORGAGNI, dem Begründer der modernen Pathologie bekannt war, dass das Blut von plötzlich Verstorbenen in flüssigem Zustand ist, wurde durch MORAWITZ klar, dass es sich um eine "Dekoagulation" des primär geronnenen Leichenblutes infolge des aktivierten fibrinolytischen Systems handelt. Es liegt also eine echte Fibrinolyse vor, und nicht - wie von einigen Forschern angenommen worden war - ein primäres Verschwinden von Fibrinogen aus der Blutbahn ohne vorherige Gerinnung.
YUDIN war es, der im Jahre 1937 in der Sowjetunion erste Anstrengungen unternahm, das Blut von frischen, plötzlich verstorbenen Leichen für den Blutspenderdienst praktisch zu verwerten. Man benutzte in der Hauptsache das Blut von Unfallopfern. Zweifellos hat sich diese Art der Blutübertragung im zweiten Weltkrieg an der sowjetischen Front sehr segensreich ausgewirkt (zit.nach MACFARLANE, R.G. und BIGGS, R.).
1933 wurde von TILLET und GARNER beschrieben, dass sich Fibringerinnsel im Blut in Gegenwart hämolytischer Streptokokken bestimmter Kulturen schnell

verflüssigen. Aus Untersuchungen von MÜLLERTZ aus dem Jahre 1953 geht eindeutig hervor, dass die Streptokinase das Fibrin nicht selbst auflöst, sondern dass sie den Proaktivator in den Aktivator des Profibrinolysins überführt.
1946 wies CHRISTENSEN das Profibrinolysin, die inaktive Vorstufe des Fibrinolysins, im Plasma nach.

In den Jahren 1948 bis 1950 fanden ASTRUP und PERMIN, FERGUSON und LEWIS sowie KAULLA und SHETTLES im Gewebe zahlreicher tierischer und menschlicher Organe ein, das Profibrinolysin aktivierendes Prinzip. Im Serum war dieser Stoff im Jahre 1951 von LEWIS und FERGUSON nachgewiesen worden. Im Jahre 1953 gelang es KLINE, das Fibrinolysin kristallin zu isolieren.
HALSE prägte 1948, in Analogie zu dem Begriff "Gerinnungspotential", den Terminus "fibrinolytisches Potential".
Das letzte Jahrzehnt hat zahlreiche Arbeiten über die klinische Bedeutung der Fibrinolyse hervorgebracht. Nachdem GOODPASTURE als erster Fälle von "fibrinolytischer Purpura" (STEFANINI, M.) bei Lebercirrhose veröffentlicht hatte, wies RATNOFF 1949 auf den Zusammenhang zwischen LAENNEC'scher Lebercirrhose und fibrinolytischer Aktivität hin. Heute weiss man, dass die gesunde Leber als Produzent von Fibrinolyseinhibitoren von eminenter Bedeutung für die Antifibrinolyse ist. Es wurden bisher zwei Proteolysehemmer im Plasma durch Elektrophorese isoliert: ein labiler Albumininhibitor und ein stabiler α_2-Globulin-Hemmer. Dem Albumininhibitor schreibt man den Antifibrinolysineffekt zu, der zur α_2-Fraktion gehörende Körper wird als Antiaktivator angesehen (ASTRUP, T.).

1950 fand WEINER ein Ansteigen der fibrinolytischen Aktivität im Blut bei drei Patientinnen mit vorzeitiger Plazentalösung.
Eine Gruppe französischer Autoren (MATHEY; DAUMET; LE BOLLOCH und FAYET) beschrieb die Erhöhung der fibrinolytischen Aktivität im Blut nach Lungenoperationen.
RATNOFF beschrieb 1952 einen Fall, bei dem infolge einer grösseren Operation wegen Cancer capitis pancreatis eine schwere, tödlich verlaufende hämorrhagische Diathese mit stark erhöhter fibrinolytischer Aktivität im Blute auftrat. Ebenso konnten 1954 zwei Mitarbeiter von BÜRGER-LEIPZIG über einen Kranken mit metastasierendem Pankreas-Carcinom berichten, der ein erhebliches Ansteigen der fibrinolytischen Aktivität im Blute zeigte und nach zwei Wochen mit ausgesprochener Fibrinogenopenie starb. Beide Autoren fanden auch eine Erhöhung der fibrinolytischen Aktivität bei metastasierendem Magen-Carcinom (SCHULZ, F.H. und KNOBLOCH, H.).
Die Steigerung der fibrinolytischen Aktivität im Blut nach schweren Verbrennungen hat GREMLIZA 1954 anhand von zwei Fällen berichtet, was nach ALBRECHTSEN auf einen moderaten Aktivatorgehalt der quergestreiften Muskulatur zurückzuführen ist.
1959 und 1960 erschienen zwei Arbeiten von LIEBERMAN, in denen er aufgrund seiner Untersuchungen an tierischem und menschlichem Gewebe zu der Auffassung gelangt, dass die Entstehung der Krankheitsbilder "hyaline-pulmonale-Membranen" und "cystische Pankreasfibrose" auf einen Mangel an Fibrinolyse-Faktoren im Gewebe der von diesen Störungen betroffenen Individuen zurückzuführen ist.

b) Aufgabenstellung dieser Arbeit

In der modernen Literatur über die fibrinolytische Aktivität von Gewebe, die überwiegend von amerikanischen und dänischen Autoren stammt, trafen wir auf einen Ausatz von ASTRUP, in dem er von einem " ... völligem Fehlen der Aktivität in der normalen, völlig entwickelten menschlichen Plazenta ..." spricht.
Es geht aus den Darlegungen von ASTRUP nicht hervor, ob er mit dieser "völlig fehlenden Aktivität" ein Fehlen des fibrinolytischen Systems oder nur ein Fehlen der fermentativen Aktivität dieses - möglicherweise vorhandenen - Systems meint.
Wir sprechen im Rahmen dieser Arbeit dann von fibrinolytisch aktivem Gewebe, wenn es in vitro spontan, d.h. ohne Aktivierung durch Streptokinase, auf dem Plasminogen-Fibrin-Gel eine Lysis erzeugt.

Bedarf das Eintreten der Fibrinauflösung auf der Testplatte einer experimentellen Aktivierung, so sprechen wir - nach HALSE - von einem"fibrinolytischen Potential" dieses Gewebes. Tritt trotz experimenteller Aktivierung keine Fibrinolyse ein (z.B.: Meerschweinchenlungen), so hat das Gewebe kein fibrinolytisches Potential.
Aus dieser Fragestellung heraus haben wir versucht, eine Klärung darüber zu gewinnen, ob das Gewebe klinisch normaler Plazenten ein fibrinolytisches Potential besitzt oder nicht.
Es ergab sich dabei auch die Notwendigkeit, anhand des Schrifttums sowie durch eigene Versuche, eine Methode zur Bestimmung des fibrinolytischen Potentiales von Gewebe auszuarbeiten.

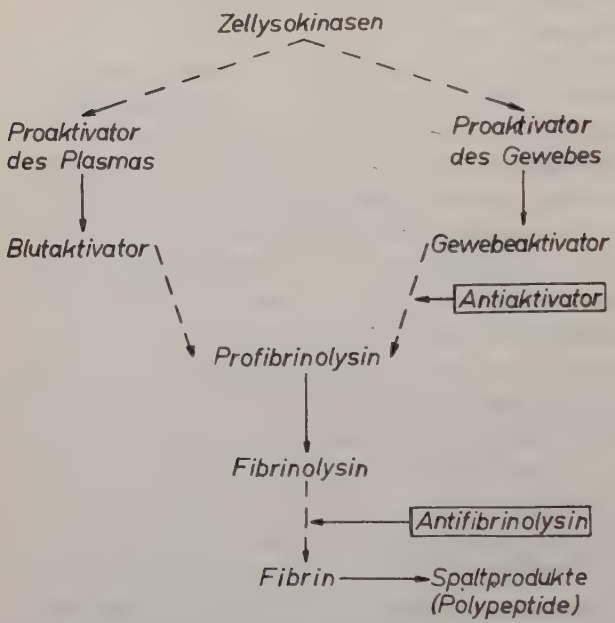
II. Die experimentelle Fibrinolyse

a) Definition des Begriffes "Fibrinolyse"

1.) Das fibrinolytische System

Die Fibrinolyse ist ein enzymatischer Vorgang. Das wirksame Ferment ist das Fibrinolysin (KLINE, D.L.) oder Plasmin. Das Fibrinolysin entsteht aus einer inaktiven Vorstufe in der Euglobulinfraktion des Plasmas, dem Profibrinolysin (=Plasminogen) und zwar durch Einwirken eines Blut- bzw. Gewebeaktivators. Nach DEUTSCH wird bei der Aktivierung des Profibrinolysins durch den Aktivator eine Ferment-Inhibitor-Verbindung gelöst. Der Aktivator liegt sowohl im Plasma (LEWIS, I.H. und FERGUSON, I.H.) als auch im Gewebe (ASTRUP, T. und PERMIN, P.M.; PERMIN, P.M.; TAGNON, H.I. und PETERMANN, H.L.) in einer inaktiven Form als sogenannter Proaktivator vor. Die Proaktivatoren werden nach ASTRUP und STERNDORFF durch Zellfermente (Lysokinasen), die offenbar unter bestimmten Bedingungen (Zelluntergang oder Zellschädigung) vom Organismus aus den Zellen freigesetzt werden, in Aktivatoren überführt.
KOLLER schreibt: "Ein physiologischer Vorgang von der Bedeutung der Fibrinolyse ist nicht denkbar ohne die Existenz einer Gegenregulation, d.h. ohne Inhibitoren. ... Sie hemmen das Fibrinolysin bzw. den Aktivator (als Antifibrinolysin = Antiplasmin bzw. Antiaktivator)". Antifibrinolysin und Antiaktivator sind kongenitale Inhibitoren. Die Antistreptokinase ist ein infolge immunologischer Vorgänge (frühere Streptokokkeninfekte) erwerbener Inhibitor (SHERRY, S.; FLETSCHER, A.P. und ALKAJERSIG, N.). Zum besseren Verständnis dieser Darlegungen sei auf das Schema 1 verwiesen.

Schema 1: Fibrinolyseschema in Anlehnung an ASTRUP und KOLLER

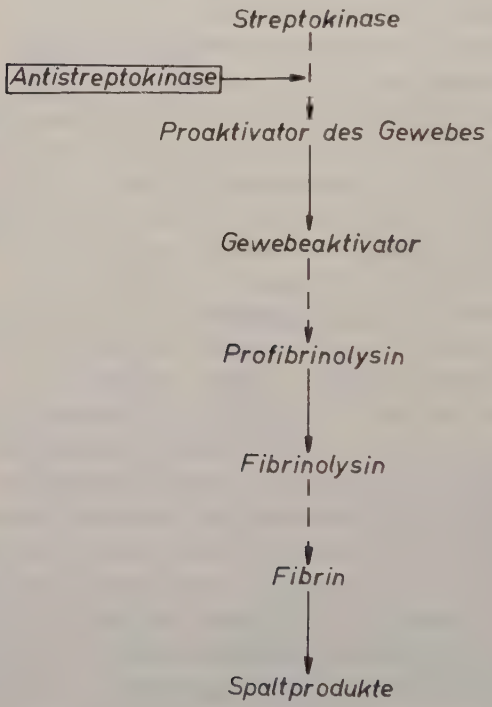


Erläuterung:
gestrichelte Linie [– – –] bedeutet ferment. Vorgang,
ausgezogene Linie [– —] bedeutet chem. Umwandlung,
umrandete Bezeichnung [▭] bedeutet fermentative Hemmung.

2.) Die experimentelle Fibrinolyse

Unter experimenteller Fibrinolyse verstehen wir das künstliche "Anstossen" der fermentativen "Kettenreaktionen", deren Endprodukt das Fibrinolysin ist. Das Fibrinolysin spaltet das Fibrin in Proteosen und Peptone. Die experimentelle Aktivierung ist auf verschiedene Weise möglich.
LOOMIS erzielte in vitro - in höchstens 30 Tagen - eine Aktivierung des fibrinolytischen Systems bei Zimmertemperatur. RATNOFF erreichte das Gleiche durch Erwärmen des Substrates auf 56°C in 1 bis 2 Stunden; es soll dabei zur Inaktivierung eines hitzelabilen Hemmkörpers kommen. Dieser Inhibitor wird ebenfalls durch Chloroform, Äther, Thymol, Harnstoff, Natriumhippurat, Natriumbenzoat und Natriumsalicylat zerstört, wie MACFARLANE und BIGGS, RATNOFF, ROCHA E SILVA und RIMINGTON, YAMAKAWA sowie JÜHLING und WÖHLISCH beschrieben haben. Eine weitere Möglichkeit, das fibrinolytische System experimentell zu aktivieren ist durch Streptokinase gegeben (MÜLLERTZ, S. und LASSEN, M.; MÜLLERTZ, S.). Die experimentelle Fibrinolyse ermöglicht es, ein Substrat - das in vivo nicht aktiviert worden war - auf sein fibrinolytisches Potential zu untersuchen. Der Gewebeaktivator ist stabil, der Blutaktivator - besonders in saurem Milieu - labil. Der Unterschied in der Stabilität ermöglicht es, zwischen diesen beiden Aktivatoren zu unterscheiden. (ASTRUP, T. und STERNDORFF, I.).
Zum besseren Verständnis dieser Darlegungen sei auf das Schema 2 verwiesen.

Schema 2: Die experimentelle Fibrinolyse



Erläuterung: siehe Schema 1.

b) Reagenzien und Methodik

1.) Veronalpuffer nach OWREN (zit.nach JÜRGENS, I. und BELLER, F.K.) - pH 7,4; Ionenstärke 0,154.

Man stellt 1000 ml einer solchen Veronalpufferstammlösung folgenderweise her: 20,62 g Veronalnatrium werden in 1000 ml Aqua destillata gelöst, dies ergibt eine n/10-Natrium-Diäthylbarbiturat-Lösung. Zu 570 ml dieser Lösung werden 430 ml n/10-Salzsäure zugesetzt und in dieser Mischung 5,67 g Natriumchlorid gelöst. Vor Gebrauch wird diese Pufferstammlösung mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.
Wir haben beobachtet, dass in der Pufferstammlösung nach mehr als 24-stündigem Stehen Barbituratkristalle ausfallen. Diese Präzipitation schwächt den Puffer nicht merklich. Es ist lediglich erforderlich, den Stammpuffer nach der Mischung mit physiologischer NaCl-Lösung zu filtrieren. Der Gebrauchspuffer soll also keine Barbituratnadeln enthalten.

2.) Bovines Fibrinogen (der DEUTSCHEN HOFFMANN - LA ROCHE A.G., Grenzach - Baden, das, adsorptiv gebunden, Plasminogen enthält.

200 mg Fibrinogen werden in 100 ml Veronalpuffer (OWREN) gelöst. Bei der Auflösung des Fibrinogens ist darauf zu achten, dass möglichst die gesamte Fibrinogensubstanz in Lösung geht, um tatsächlich eine 0,2%-ige Lösung zu erhalten. Andernfalls bekommt man in den einzelnen Ansätzen unterschiedliche Fibrinogenkonzentrationen, wodurch der quantitative Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsserien unmöglich würde. Es sei darauf hingewiesen,

dass es nie gelingt, die abgewogene Fibrinogenmenge zu 100% in der dafür berechneten Pufferquantität in Lösung zu bringen; denn immer setzen sich Spuren von Fibrinogen an der Wandung des Glasgefässes fest. Diese Mengen sind jedoch so gering, dass sie eine genaue Auswertung der Befunde praktisch nicht beeinträchtigen.
Um eine optimale Lösung des Fibrinogens zu erreichen, hat sich uns folgendes Vorgehen als nützlich erwiesen: in ein Becherglas von 400 ml Rauminhalt werden 50 ml Pufferlösung - mit einer Temperatur von 37°C-gefüllt. Danach streut man das Fibrinogenpulver auf das Lösungsmittel. Dabei darf das Fibrinogen nicht an die Glaswand gestäubt werden. Hat man den Eindruck, dass die Flüssigkeit kein Eiweisspulver mehr in Lösung nimmt, so muss man das Becherglas abgedeckt (Flüssigkeitsverlust) in den Wärmeschrank stellen und einige Minuten zuwarten. Sodann kann man gewöhnlich die zweite Hälfte einer 200 mg - Ampulle in Lösung geben. Ist dies geschehen, so stellt man die Fibrinogen-Veronalpufferlösung wiederum in den Brutschrank und wartet die "Spontanquellung" (JÜRGENS, I. und BELLER, F.K.) ab, was nach ca. 7 Minuten der Fall ist. Nunmehr ist die Fibrinogenlösung gebrauchsfertig.
JÜRGENS und BELLER (54) empfehlen, das auf die Lösungsflüssigkeit geschüttete Fibrinogenpulver "mit einem Glasstab unter die Oberfläche" der Pufferlösung zu stossen. Dieses Verfahren hat sich bei uns nicht bewährt. Wir sahen bei seiner Anwendung grosse Fibrinogenverluste durch Verklumpen des Eiweisses und durch Haften am Glasstab. Fibrinogen, das an feuchtem Glas klebt, bzw. verklumpt, ist praktisch nicht mehr lösbar, d.h. für die Überführung in Fibrin verloren.

3.) Aus Rinderplasma gewonnenes Thrombin ("Topostasin" der DEUTSCHEN HOFFMANN - LA ROCHE A.G., Grenzach - Baden). 2 mg Thrombin lösten wir in 2 ml physiologische Kochsalzlösung (0,1%-ige Lösung).

4.) Streptokinase - Streptodornase ("Varidase" der LEDERLE - CYANAMID, München). Der Inhalt einer Flasche (20000 E Streptokinase und 5000 E Streptodornase) wurde in 4 ml 0,85%-iger Natriumchloridlösung gelöst. Beim Auflösen der "Varidase" sind Schütteln und Schaumbildung zu vermeiden, da ihre Wirksamkeit dadurch stark beeinträchtigt würde (ROSOLLECK, H.), wie wir es früher selbst, in Unkenntnis dieser Zusammenhänge, einige Male erlebt haben.
Die "Varidase"-Lösung kann bei 4 bis 10°C 8 Tage ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

5.) Vorbereitung der Geräte:
Wir müssen zunächst darauf hinweisen, dass die zur Benutzung kommenden Geräte (Glasgefässe und Pipetten) unbedingt sauber und steril sein sollen. Finden sich Fibrinreste (aus vorhergehenden Versuchen) in den Geräten, so tritt eine Minderung der Thrombinwirkung ein, da das Fibrin eine adsorbierende Wirkung auf das Thrombin hat (JÜRGENS, I. und BELLER, F.K.).
Die Sterilisation ist deshalb zu fordern, weil bei der Verwendung unsteriler Instrumente die Bildung unspezifischer bakterieller Proteinasen möglich ist.

Nach JÜRGENS, I. und BELLER führten wir die Reinigung der Glasgegenstände folgenderweise durch:
aa) 24-stündiges Einweichen in entspanntem Wasser - als Detergenz (HAUSCHILD, F.) benutzten wir "REI" -.
bb) Bürstenreinigung mit Kernseife.

cc) Abspülen mit Leitungswasser.
dd) 24-stündiges Lagern in Chromschwefelsäure.
ee) 24-stündiges Spülen unter fliessendem Wasser (Überlaufbecken).
ff) Spülen mit Aqua destillata.
gg) Dampfsterilisation.

6.) Das Herstellen der Fibrinplatten

aa) Die Fibrin-Profibrinolysin-Platte:

In eine Petrischale mit einem Durchmesser von 80 mm pipettierten wir 0,2 ml der 0,1%-igen Thrombinlösung. Durch Schütteln in der Horizontalebene wurde die aufgetropfte Flüssigkeit gleichmässig über den Boden der Schale verteilt. Sodann gaben wir 10 ml der 0,2%-igen Fibrinogenlösung in die mit Thrombin beschickte Petrischale. Ein kurzfristiges Schwenken derselben bis zu 10 Grad sorgte für die gleichmässige Verteilung der Lösung über die Platte, die dann auf eine planparallele Unterlage gestellt wurde, um eine gleichmässige Stärke des Fibrinfilms zu erhalten. Nach unseren Erfahrungen ist es zweckmässig, die frisch gegossenen Platten, nur halb bedeckt, 3 bis 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen zu lassen. Das Gel hat so genügend Zeit sich zu festigen. Die Bildung von Kondenswasser innerhalb der Petrischale konnten wir auf diese Weise fast völlig unterbinden. Die Fibrinschicht darf jedoch nicht zu lange der Luft ausgesetzt werden, da sie sonst austrocknet.

Die so gewonnene Fibrinplatte enthält neben dem Fibrin die Vorstufe des fibrinolytischen Fermentes Fibrinolysin (Plasmin), nämlich das Profibrinolysin (Plasminogen), da, wie oben schon erläutert, dieses Proferment in adsorptiver Bindung an das Fibrinogen, in der Euglobulinfraktion des Plasmas enthalten ist.

Eine Methode zur Herstellung profibrinolysinfreien Fibrinogens ist noch nicht bekannt (LASSEN, M.). Zeigt die Fibrin-Profibrinolysin-Platte im Plattentest eine Lysis, so ist damit noch nicht geklärt, ob es sich um eine Aktivierung des Profibrinolysins, d.h. um einen fibrinolytischen Effekt im Sinne des zu untersuchenden Fermentsystems oder um die Wirkung unspezifischer proteolytischer Enzyme (Trypsin; Chymotrypsin; bakterielle Proteinasen) handelt.
Diese Differenzierung wird ermöglicht durch
bb) die Fibrin-Platte (die sogen."Hitze-Platte").
LASSEN hat darauf hingewiesen, dass Profibrinolysin durch Erhitzen denaturiert wird. Die Qualität des Fibrinfilmes leidet nicht unter dieser Prozedur.

Wir setzten die vollständig abgedeckten Platten für 35 Minuten einer Temperatur von 85°C aus. Nach dem Erhitzen liessen wir die Platten 30 Minuten mit halbgeöffnetem Deckel stehen, abermals, um die Kondenswasserbildung weitgehend zu hemmen.

7.) Das Aufbewahren der Fibrinplatten
Aus wirtschaftlichen und praktischen Erwägungen war es notwendig, immer einen Vorrat an gebrauchsfertigen Platten zur Verfügung zu haben. Daraus ergab sich das Problem der Konservierung der Fibrinplatten.
Wir versuchten zunächst, die Fibrinplatten im Kühlschrank aufzubewahren. Es zeigte sich jedoch, dass das Fibrin sowohl bei einer Temperatur zwischen 4 und 10°C als auch bei einer Temperatur von minus 25°C (in der Kühltruhe) schon nach ungefähr 5 Stunden denaturiert ist.
Wir fanden, dass die Fibrinplatten bei Zimmertemperatur am längsten zu erhalten sind. So haben wir Fibrinplatten, die über 120 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden waren benutzt, ohne - im Ver-

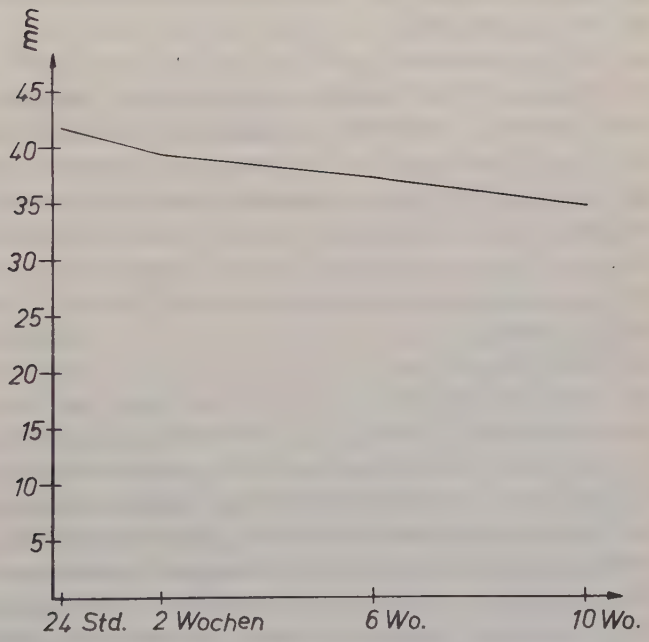
gleich mit frischen Platten - einen Nachteil zu sehen.

8.) Aufbewahrung des Gewebes:
Das Plazentagewebe kam entweder frisch, d.h. zwischen 15 Minuten und 3 Stunden (CLIFFTON, E.E. und GROSSI, C.E.) nach deren Geburt zur Testung oder es wurde für längere Zeit in der Kühltruhe bei minus 25°C aufbewahrt. Das Gleiche gilt für das von Ratten und Meerschweinchen stammende Kontrollgewebe: hatten wir die Möglichkeit das Material bis spätestens 3 Stunden nach der Tötung und Obduktion der Versuchstiere zu testen, so wurde es bei einer Temperatur zwischen 4 und 10°C verwahrt. Gewebe, das längere Zeit gelagert werden musste, kam ebenfalls in die Kühltruhe.
Wir haben eine Serie von 5 Plazenten nach festgelegten zeitlichen Intervallen wiederholt auf ihre fibrinolytische Fermentintensität untersucht und dabei nur geringe Abnahme der Fermentwirkung bei den in der Kühltruhe aufbewahrten Plazenten finden können.
Die Tabelle 1 und die Figur 1 geben einen Überblick über den Aktivitätsabfall bei 5 Plazenten, die in einem Zeitraum von 10 Wochen wiederholt untersucht worden sind.

Tabelle 1

Plazenta-Nr.	Arhythmetisches Mittel der Lysiszonendurchmesser in Millimeter, gemessen nach:			
	24 Std.	2 Wochen	6 Wochen	10 Wochen
600/60	37,5	36	34,5	32,5
659/60	39,5	37,5	36	33,5
777/60	43	40,5	38	35,5
776/60	40,5	37,5	35	33,5
780/60	48,5	46,5	44	40

Fig. 1:



Die Abszisse der graphischen Darstellung in Figur 1 stellt den Zeitvektor dar, auf der Ordinate ist der arhythmetische Mittelwert zweier senkrecht zu einander ermittelter Durchmesser der Lysishöfe aufgetragen.
Wie die Kurve zeigt, liegt der relativ stärkste Abfall des fibrinolytischen Potentials von den in der Kühltruhe aufbewahrten Plazenten zwischen dem 1.und 14.Tag.

9.) Die Präparation des Plazentagewebes
Es kamen 99 Plazenten aus einem klinisch unauffälligem Geburtsverlauf und einer normalen Nachgeburtsperiode zur Testung.
aa) Wir legten Gewebspartikel mit einem Gewicht von ca.100 mg auf die Fibrinplatten. Das von verschiedenen Autoren (CLIFFTON und GROSSI; LIEBERMANN) beschriebene Abmessen der Gewebswürfel fanden wir - insbesondere für Plazentagewebe - ungeeignet, weil es, bedenkt man die Konsistenz der Gewebe und die Kleinheit der gewünschten Würfel (etwa 4:4:4 mm), viel zu ungenau ist, um Gewebsstücke gleicher Größe zu ergeben.
Die Plazentaspülung:
Ihre Aufgabe ist es, möglichst viel Blut aus der frischgeborenen Plazenta zu entfernen, um einen Einfluss von Blutfaktoren auf die experimentelle Fibrinolyse auszuschliessen. Wir haben im Abschnitt "Definition der experimentellen Fibrinolyse" dieser Abhandlung auf die bekannte Tatsache hingewiesen, dass der Blutaktivator labil ist, d.h., in unserem Falle garnicht mehr zur Wirkung kommen kann. So ist das Spülen des Plazentagewebes in unseren Testreihen als eine "doppelte Sicherung" aufzufassen.

Zur Plazentaspülung wird eine Knopfkanüle in die Vena umbilicalis eingebunden. Die freipräparierten Arteriae umbilicales werden offengelassen. Als Spülflüssigkeit wurde physiologische Kochsalzlösung verwendet, pro Plazenta die Menge von 450 ml. Nach HÖRMANN und LEMTIS "... beträgt die durchschnittliche Kapazität des fetalen Gefässapparates der Plazenta 90 bis 100 ml ..., was dem Blutgehalt der Plazenta bei Frühabnabelung des Neugeborenen entspricht". Die Spülflüssigkeit wurde ohne Kraftaufwendung mittels einer Spritze über die Knopfkanüle in das Organ injiziert.
Auf diese Weise konnten wir eine grosse Menge fetalen Blutes aus der Plazenta entfernen, was daran zu erkennen ist, dass das Plazentagewebe infolge der Spülung seine hellgraue Eigenfarbe annimmt.

Ungespültes Plazentagewebe
Um das fibrinolytische Potential gespülten und ungespülten Plazentagewebes vergleichen zu können, kamen von 15 Plazenten Gewebsproben zur Untersuchung, die vor der Spülung aus dem Organ entnommen worden waren. Die Tatsache, dass die von uns gefundenen Unterschiede zwischen gespülten und nichtgespültem Gewebe sehr gering sind (die Schwankungen dürften im Bereich der quantitativen Fehlerbreite liegen), spricht durchaus für die Befunde von ASTRUP und STERNDORFF, dass der Blutaktivator labil ist und somit bei der Testung des fibrinolytischen Potentials von Gewebe ohne Einfluss auf den Ablauf der experimentellen Fibrinolyse ist.
In Tabelle 2 und Figur 2 sind die Vergleichswerte von gespültem und ungespültem Plazentagewebe dargestellt.

Fig. 2:

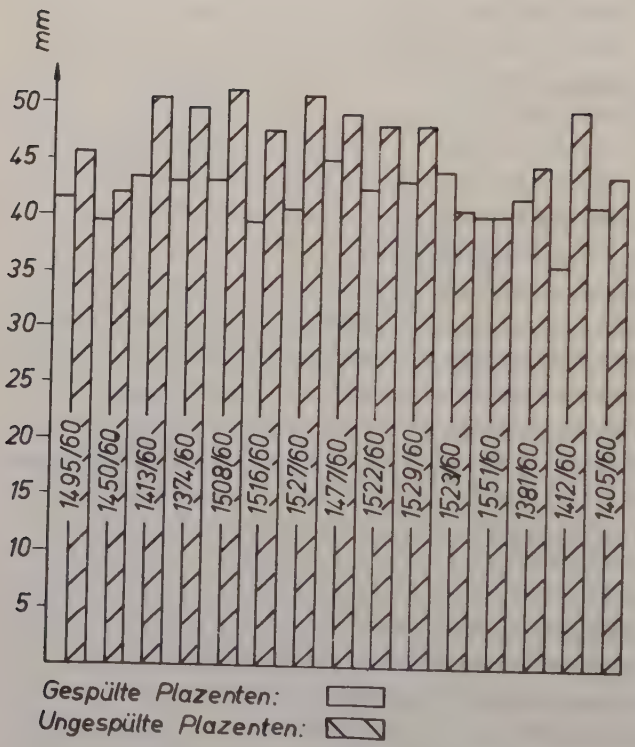

mm
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
1495/60
1450/60
1413/60
1374/60
1508/60
1516/60
1527/60
1477/60
1522/60
1529/60
1523/60
1551/60
1381/60
1412/60
1405/60
Gespülte Plazenten:
Ungespülte Plazenten:

Tabelle 2

Lfd. Nr.	Plazenta-Nr.	Lysiszonendurchmesser in Millimeter gespült	ungespült
1.	1495/60	40;43	45;46
2.	1450/60	38;41	42;42
3.	1413/60	44;43	50;51
4.	1374/60	42;44	49;50
5.	1508/60	43;43	51;51
6.	1516/60	40;39	47;48
7.	1527/60	38;43	49;52
8.	1477/60	43;47	48;50
9.	1522/60	41;44	48;48
10.	1529/60	43;43	48;48
11.	1523/60	44;44	41;40
12.	1551/60	38;42	40;40
13.	1381/60	39;44	44;45
14.	1412/60	32;39	49;50
15.	1405/60	41;41	44;43

bb) Gewebshomogenate

Auch mit einer subtilen Spültechnik gelingt es nicht, das gesamte Blut aus einer Plazenta zu entfernen. Das ist jedoch durch Homogenisieren möglich.

Wir haben Gewebe von 5 Plazenten 2 Minuten bei 15000 U/min. in physiologischer NaCl-Lösung homogenisiert, das Homogenat zentrifugiert und durch dreimaliges Waschen in physiologischer Natriumchloridlösung und wiederholtes Rezentrifugieren soweit gereinigt, bis die überstehende Lösung glasklar war.

Die Gewebshomogenate zeigten auf der Fibrinplatte keine signifikante Differenz ihres fibrinolytischen Potentials im Vergleich mit äquivalenten Mengen von gespülten, bzw. nichtgespülten Gewebspartikeln.

c) Untersuchungen zur Bestimmung des fibrinolytischen Potentialss verschiedener Gewebe.

Zur Ermittlung des Aussagewertes unserer Methode erschien uns die Klärung folgender Fragen von Bedeutung:

1.) Löst jedes, durch Streptokinase-Streptodornase-Lösung aktivierte tierische bzw. menschliche Gewebe auf der Fibrin-Plasminogen-Platte eine Fibrinolyse aus?

2.) Ist Gewebe - bei dem man eine intravitale bzw. prämortale Aktivierung des fibrinolytischen Systems mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als nicht vorhanden annehmen kann - in der Lage, ohne Aktivierung einen fibrinolytischen Effekt auf der Testplatte zu bewirken?

3.) Kann Streptokinase-Streptodornase-Lösung - ohne die Gegenwart von Gewebe - einen plasminogenhaltigen Fibrinfilm auflösen?

Rattengewebe.

Ad 1): LIEBERMAN fand, dass das Lungengewebe von Ratten eine fibrinolytische Aktivität im Plattentest zeigt.
Wir untersuchten Lungen-, Herz-, Leber- und Nierengewebe von 15 Ratten. Alle 15 Tiere zeigten - nach Aktivierung der Gewebe mit Streptokinase - Streptodornase - eine ausgesprochene fibrinolytische Aktivität des Lungengewebes. Bei einem Tier fand sich ein fibrinolytisches Potential mittleren Grades im Herzmuskelgewebe. Ein weiteres Tier hatte im Herzmuskel eine "Spur" an fibrinolytischer Aktivität. Bei den übrigen Ratten zeigte der

Test keinen Gewebeaktivator an; ebenso waren Leber- und Nierengewebe bei allen Ratten negativ.

Meerschweinchen.

Aus den Untersuchungen von LIEBERMAN geht weiter hervor, dass Meerschweinchenlungen - auch nach experimenteller Aktivierung - keine fibrinolytische Aktivität entfalten.
Von 6 Meerschweinchen wurden Lungen-, Herz-. Leber- und Nierengewebe getestet. Eine Fibrinolyse wurde nicht beobachtet.

Ad 2): Wir haben bei der Untersuchung von Plazenta- und Rattengewebe ohne experimentelle Aktivierung - bei gleichzeitiger Negativität auf der"Hitzeplatte" - nie einen fibrinolytischen Effekt beobachtet. Sämtliche, in dieser Arbeit beschriebenen Teste wurden parallel, mit und ohne Streptokinaseaktivierung, je auf einer Fibrin-Plasminogen-Platte und einer Fibrin-Platte durchgeführt. Es wurden nur die Gewebsproben verwertet, die auf der Fibrinplatte ("Hitze-Platte") keine Lysis hervorgerufen hatten.

Ad 3): Wir haben eine Anzahl von Fibrin-Platten - mit und ohne Profibrinolysingehalt - verschiedenen Alters mit Streptokinase-Streptodornase- Lösung der gleichen Konzentration wie für die Gewebeaktivierung versetzt und 24 Stunden bebrütet- Die Auflösung des Fibrinfilmes konnte nicht - auch nicht in "Spuren" - beobachtet werden.

d) Untersuchungen zur Bestimmung des fibrinolytischen Potentials von menschlichen Plazenten.

1.) Belegen der Fibrinplatten:
Wir legen auf eine Fibrinplatte maximal 4 Gewebe-

stückchen (PERMIN, P.M.), so, dass jedes Gewebeteilchen in die Mitte eines der vier Felder zu liegen kommt, die durch Einritzen von zwei senkrecht aufeinander stehenden Durchmessern auf der Aussenseite des Plattenbodens gekennzeichnet sind.

2.) Die Aktivierung des Gewebes:
Nachdem das Gewebe auf den Fibrinfilm gebracht wurde, tropften wir mit Hilfe einer 1 ml-Pipette mit 0,01 ml-Einteilung 0,05 ml Streptokinase-Streptodornase-Lösung auf. Von jeder Gewebsprobe kam auch nichtaktiviertes Gewebe zur Testung.

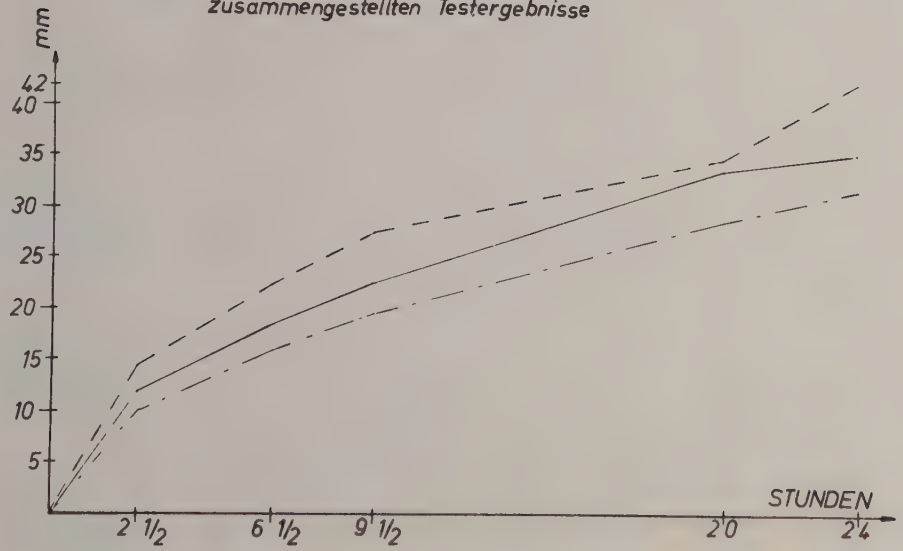
3.) Die Inkubation der Testplatten:
Die abgedeckten Petri-Schalen kommen bei 37°C in den Thermostaten. Dabei ist streng darauf zu achten, dass die Schalen waagrecht stehen, um ein Ineinanderlaufen von Gewebsflüssigkeit bzw. Streptokinase-Lösung zu vermeiden.
Wir kontrollierten das Ausmass der lytischen Zonen im Fibrinfilm nach 2 1/2, 6 1/2, 9 1/2, 20 und 24 Stunden. So hatten wir die Möglichkeit, eine eventuell auftretende hochgradige fibrinolytische Aktivität eines Gewebsstückes zu erkennen, bevor seine lytische Zone in die Testfelder der benachbarten Gewebe einbrach.
In Tabelle 3 und Figur 3 geben wir einen Überblick über die fibrinolytische Stärke von streptokinase-aktiviertem Plazentagewebe in vitro in Abhängigkeit von der Dauer der Bebrütungszeit. Da wir nach mehr als 24 stündigem Inkubieren keine wesentliche Vergrösserung der Lysiszonen beobachtet haben, setzten wir für unsere Untersuchungen die Dauer der Inkubation auf 24 Stunden fest.

Tabelle 3

Die fibrinolytische Aktivität von Plazentagewebe auf der Fibrin-Plasminogen-Platte in Abhängigkeit von der Zeit, dargestellt an 17 klinisch unauffälligen Plazenten.

Aufn.-Nr.der Schwang.	Zwei senkrecht zueinander stehende Durchmesser des Lysishofes, gemessen in Millimeter. In Klammern das arhythmetische Mittel der beiden Diameter. Die Messung erfolgte nach einer Bebrütungszeit von: 2 1/2h	6 1/2h	9 1/2h	20h	24h
1265/60	14;15(14,5)	19;26(22,5)	24;31(27,5)	38;31(34,5)	41;34(37,5)
1285/60	12;12(12,0)	19;19(19,0)	23;23(23,0)	32;33(32,5)	35;36(35,5)
1264/60	11;11(11,0)	18;18(18,0)	23;21(22,0)	31;36(33,5)	34;39(36,5)
1188/60	12;12(12,0)	18;20(19,0)	19;24(21,5)	35;31(33,0)	38;34(36,0)
1177/60	13;14(13,5)	20;20(20,0)	25;25(25,0)	39;37(38,0)	42;40(41,0)
1178/60	12;10(11,0)	16;16(16,0)	20;19(19,5)	29;28(28,5)	32;31(31,5)
1242/60	12;11(11,5)	18;18(18,0)	21;22(21,5)	32;32(32,0)	35;35(35,0)
1241/60	11;11(11,0)	17;17(17,0)	20;20(20,0)	29;29(29,0)	32;32(32,0)
1227/60	12;13(12,5)	20;20(20,0)	27;24(25,5)	40;36(38,0)	43;39(41,0)
1235/60	9;13(11,0)	19;19(19,0)	24;26(25,0)	41;34(37,5)	44;37(40,5)
1314/60	10;10(10,0)	16;16(16,0)	26;20(23,0)	33;29(31,0)	36;32(34,0)
1290/60	11;11(11,0)	18;18(18,0)	21;20(20,5)	30;31(30,5)	33;34(33,5)
1291/60	11;12(11,5)	18;18(18,0)	21;21(21,0)	34;37(35,5)	37;40(38,5)
1323/60	12;12(12,0)	17;17(17,0)	20;20(20,0)	28;36(32,0)	31;39(35,0)
1354/60	12;14(13,0)	19;19(19,0)	23;23(23,0)	32;32(32,0)	35;35(35,0)
1311/60	11;10(10,5)	18;18(18,0)	22;22(22,0)	37;33(35,0)	40;36(38,0)
1320/60	13;14(13,5)	20;20(20,0)	25;22(23,5)	41;37(39,0)	44;40(42,0)
Summe der arhythmet. Mittel:	201,5	314,5	383,5	570,5	594,5
Mittelwert: (——— Kurve)	11,8	18,5	22,5	33,5	34,9
Maximalwert: (– – – Kurve)	14,5	22,5	27,5	34,5	42,0
Minimalwert: (–·–·–· Kurve)	10,0	16,0	19,5	28,5	31,5

Fig. 3: Graphische Darstellung der in Tab. 3 zusammengestellten Testergebnisse



4.) Das Messen der Lysiszonen:

Zur Messung der Lysiszonen stellen wir die Petrischalen auf schwarzes Papier, nehmen die Deckel ab und bestimmen mit einer Schublehre zwei senkrecht aufeinander stehende Durchmesser. Die bereits erwähnten Durchmesser im Schalenboden dienen bei der Messung zur Orientierung, damit die gemessenen Strecken tatsächlich im Winkel von 90° zueinander stehen. Es wurden nur die Teste verwertet, bei denen es nicht zu einer Lysis auf der "Hitze-Platte" gekommen war.

II. Ergebnisse

Mit Ausnahme der Plazenta Nr.9760/59 - hier lag ein Diabetes mellitus der Mutter vor. Hydramnion von 5000 ml. Pathologisch-anatomischer Befund: Embryopathia diabetica; Riesenkind, Anencephalus (Sektionsbefund von Prof.K.KLOOS - S.Nr. 538/60) stammen sämtliche Plazenten aus einem klinisch unauffälligen Geburtsvorgang.
In der Tabelle 4 sind die Werte der fibrinolytischen Aktivität des getesteten Plazentagewebes aufgezeichnet. Alle Werte stammen von gespülten Plazenten. Die durch Semikolon getrennten Zahlen stellen zwei senkrecht aufeinander stehende Durchmesser der Lysiszonen dar. Der Wert wurde nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden abgelesen.

Tabelle 4

Lfd.Nr.	Plazenta-Nr.	Lysiszonendurchmesser
1.	524/60	42;43
2.	524/60	41;41
3.	600/60	37;38
4.	659/60	40;39
5.	9760/59	41;42
6.	777/60	42;44
7.	776/60	40;42
8.	780/60	52;46
9.	779/60	46;48
10.	797/60	51;52
11.	814/60	48;50
12.	778/60	48;44
13.	782/60	46;48
14.	793/60	42;42
15.	837/60	46;46
16.	853/60	44;45
17.	879/60	42;43
18.	889/60	46;46
19.	919/60	45;39
20.	785/60	36;37
21.	905/60	42;44
22.	952/60	38;38
23.	993/60	36;38
24.	969/60	40;40
25.	980/60	46;42
26.	979/60	40;41
27.	895/60	40;37
28.	1002/60	42;42
29.	1004/60	43;43
30.	974/60	39;39
31.	1013/60	39;41
32.	1012/60	43;41
33.	1006/60	40;39

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Lfd.Nr.	Placenta-Nr.	Lysiszonendurchmesser
34.	1015/60	40;41
35.	1016/60	38;40
36.	1158/60	42;42
37.	1133/60	42;44
38.	1157/60	42;45
39.	1131/60	50;41
40.	1067/60	42;41
41.	1047/60	40;42
42.	1098/60	42;42
43.	1072/60	41;41
44.	1495/60	40;43
45.	1450/60	38;41
46.	1413/60	44;43
47.	1374/60	42;44
48.	1508/60	43;43
49.	1516/60	40;39
50.	1527/60	38;43
51.	1477/60	43;47
52.	1522/60	41;44
53.	1529/60	43;43
54.	1523/60	44;44
55.	1551/60	38;42
56.	1381/60	39;44
57.	1412/60	32;39
58.	1405/60	41;41
59.	1265/60	41;34
60.	1285/60	35;36
61.	1264/60	34;39
62.	1188/60	38;34
63.	1177/60	42;40
64.	1178/60	32;31
65.	1242/60	35;35
66.	1241/60	32;32

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Lfd.Nr.	Placenta-Nr.	Lysiszonendurchmesser
67.	1227/60	43;39
68.	1235/60	44;37
69.	1314/60	36;32
70.	1290/60	33;34
71.	1291/60	37;40
72.	1323/60	31;39
73.	1354/60	35;35
74.	1311/60	40;36
75.	1320/60	44;40
76.	1635/60	48;50
77.	1641/60	52;51
78.	1585/60	48;51
79.	1563/60	48;49
80.	1564/60	47;50
81.	1560/60	46;45
82.	1552/60	52;53
83.	1557/60	22;24
84.	1732/60	44;44
85.	1485/60	48;46
86.	1780/60	23;26
87.	1772/60	46;44
88.	1766/60	44;46
89.	1147/60	35;32
90.	1783/60	44;42
91.	1601/60	45;43
92.	1531/60	41;39
93.	1682/60	37;38
94.	1672/60	37;37
95.	1666/60	40;37
96.	1746/60	34;36
97.	1724/60	40;42
98.	1712/60	38;41
99.	1708/60	46;44

III. Diskussion

a) Erörterung der Methode:
Der Fibrin-Platten-Test gestattet den Nachweis des inaktiven Proaktivators des Profibrinolysins im Gewebe dadurch, dass dieser durch Streptokinase-Streptodornase in den Profibrinolysinaktivator überführt wird. Der Aktivator wirkt auf das Profibrinolysin, welches - adsorptiv an das Fibrin gebunden - in der nicht erhitzten Fibrinplatte enthalten ist. Damit wird das Profibrinolysin zum Fibrinolysin; das letztere entfaltet seine Fermentwirkung auf das Fibrin.
Das Ausmass des lytischen Hofes auf der Platte steht in einem direkt proportionalem Verhältnis zur vorhandenen Menge an Proaktivator des Gewebes.

Der Fibrin-Platten-Test ist ein - in begrenztem Masse - quantitativer Test.
Diese Begrenzung ist im Wesentlichen dadurch bedingt, dass
1.) die verwendeten Petrischalen (wie sie auch in der Bakteriologie gebräuchlich sind) nicht einheitliche Masse haben. Wir registrierten bei den verwendeten Schalen maximale Schwankungen der Durchmesser von $\pm$ 1,5 mm.
2.) die Plattenböden nicht streng planparallel sind. Die Folge davon ist eine ungleichmässige Schichtdicke des Fibrinfilms.
3.) die Lysishöfe nie genau kreisrund sind, und somit auch durch das Ausmessen zweier Durchmesser und Ermittlung deren arhythmetischen Mittels nicht genau auf die Fläche des Lysishofes geschlossen werden kann.
Die Methode ist nicht geeignet, im Falle des Fehlens eines fibrinolytischen Potentiales zu diffe-

renzieren, ob ein Mangel an Proaktivator oder ein Überschuss an Inhibitoren (Antiaktivator) vorliegt (LIEBERMANN, I. u.a.).
Es ist mit dieser Methode möglich, durch die sogenannte "Hitze-Platte" das Vorhandensein unspezifischer Proteinasen (Trypsin, Chymotrypsin, bakterielle Proteinasen) auszuschliessen.

Erörterung der Ergebnisse:
Wir fanden bei 99 getesteten Plazenten ein "fibrinolytisches Potential". Die gleichen Plazenten zeigten ohne Streptokinasezusatz keine "fibrinolytische Aktivität".
Daraus schliessen wir:
Das Gewebe normaler, reifer Plazenten besitzt einen inaktiven Aktivator des Profibrinolysins, d.h. ein "fibrinolytisches Potential".
ASTRUP schreibt:"...Die Untersuchungen haben des weiteren völliges Fehlen der Aktivität in der normalen, völlig entwickelten menschlichen Plazenta gezeigt. Wie im Endometrium und in der Dezidua dürfte die Anwesenheit des Gewebeaktivators in der Plazenta ein Risiko für Lokalblutungen mitführen, weswegen der negative Fund gut mit den oben ausgeführten Betrachtungen übereinstimmt. Die Möglichkeit, dass gewisse Formen vorzeitiger Plazentalösung durch Anwesenheit fibrinolytischer Aktivität im Plazentagewebe verursacht werden können, wurde erwogen, doch konnten wir für einen solchen Zusammenhang keinen Nachweis erbringen. Wir haben indessen nur Gelegenheit gehabt, eine äusserst begrenzte Anzahl pathologischer Plazentae zu untersuchen".

ASTRUP hat im Plazentagewebe nach einem aktiven Aktivator gesucht, und da er diesen auch "... in

einer äusserst begrenzten Anzahl pathologischer Plazentae ..." - nicht fand, daraus geschlossen, dass ein solcher Aktivator im Plazentagewebe grundsätzlich nicht vorhanden ist.
ASTRUP findet seine "negativen" experimentellen Befunde durch die theoretische Erwägung, dass "...die Anwesenheit des Gewebeaktivators in der Plazenta ein Risiko für Lokalblutungen mitführe...", bestätigt.
Bedenkt man, dass die Gewebe - so auch das Plazentagewebe - nicht nur aktivierende sondern auch hemmende Faktoren enthalten, so ist erklärt, dass trotz der von uns gefundenen Aktivatorvorstufe für die Profibrinolysinaktivierung normalerweise ein "...Risiko für Lokalblutungen..." nicht besteht. Wird das Gleichgewicht zwischen Aktivatoren und Inhibitoren durch pathologische Vorgänge gestört, so kann es zu einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems kommen, deren Folge eine "Fibrinolytische Purpura" (STEFANINI, M.) sein kann, wie im klinischen Schrifttum einige Male beschrieben ist. (DE LEE, L.B.; - WEINER, A.E.; REID, D.E. und ROBY, C.C.; - DE NICOLA, P.)
Die physiologische Bedeutung des fibrinolytischen Potentiales von Plazentagewebe scheint uns im wesentlichen darin zu bestehen, dass es die Abscheidung von Thromben im intervillösen Raum zu verhindern hat. Derartige Thromben in grosser Menge dürften die Kapazität des mütterlichen Blutraumes der Plazenta einschränken - und damit ihre Funktion, den Gasaustausch, erschweren oder unmöglich machen.
Somit kommt dem fibrinolytischen Potential von Plazentagewebe - ebenso wie es LIEBERMAN für das Lungengewebe postuliert hat - eine bedeutungsvolle Aufgabe für die Funktionsfähigkeit des Organes zu.

Zusammenfassung

1.) LIEBERMAN, J. beschrieb 1959 einen Zusammenhang zwischen Fibrinabscheidungen in den Ductus alveolares der Neugeborenen Lungen (sogen.Hyaline-pulmonale Membranen) mit einer Störung des fibrinolytischen Potentials des Lungengewebes.

2.) Analog zu diesem Problem interessierte die Frage, ob ein ähnlicher Zusammenhang für das variable Vorkommen von hyalinen Thromben im intervillösen Raum der Plazentae und der fibrinoiden Zottennekrosen der Plazenten verantwortlich ist. Es gibt darüber kaum Angaben in der Literatur; sie sind zudem widerspruchsvoll und unklar.

3.) Die von ASTRUP, T. und MÜLLERTZ, S. angegebene "Fibrin-Platten-Methode" zur Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität wurde kritisch geprüft, modifiziert und ausgebaut. Es gelingt mit dieser Methode die "fibrinolytische Aktivität" von frischem oder unterkühltem Gewebe halbquantitativ nachzuweisen. Unter Zusatz von Lysokinase (Streptokinase-Streptodornase) lässt sich das "fibrinolytische Potential" bestimmen.

4.) "Fibrinolytische Aktivität" von Gewebe bedeutet das Vorhandensein eines intravital aktivierten fibrinolytischen Systems. Unter den gewählten Umständen spielt die Konkurrenz der labilen Aktivatoren des Blutes keine Rolle.

5.) Bei gesunden, ausgetragenen Plazenten besteht ein fibrinolytisches Potential des Gewebes. Die Bedeutung dieses Fermentsystems für die Physiologie der Fetalperiode (Verhinderung von Fibrinabscheidungen im intervillösen Raum) und für die Pathophysiologie der postpartalen Periode (fibrinolytische Purpura) wurde erörtert und bedarf weiterer quantitativer analytischer Untersuchungen.

Literaturverzeichnis

1. Albrechtsen, O.K.: The fibrinolytic activity of human fissue. Brit.J.Haemat. 3:284 (1957)

2. Astrup, T.: Fibrinolysis in the organism. Blood V.XI,Nr.9 S.781 (Sept.1956)

3. Astrup, T.: Medizinische Grundlagenforschung. Herausgeb.: K.Fr.Bauer (Erlangen) Bd.II, S.: 195 ff Georg Thieme, Stuttgart, 1959

4. Astrup, T. and Müllertz, S. (Dänemark): The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. of Biochemistry and Biophysics V.40, 346, 1952

5. Astrup, T. and Permin, P.M.: Fibrinokinase and fibrinolytic enzymes. Nature 161 (1948), 689

6. Astrup, T. and Sterndorff, I.: The plasminogenaktivator in animal tissue. Acta physiol.Scand. 36 (1956), 250

7. Astrup, T. and Sterndorff, I.: Fibrinolysokinase activity in animal and human tissue. Acta physiol.Scand. 37 (1956), 40

8. Christensen, L.R.: The activation of plasminogen by chloroform. J.gen.Physiol.30:149 (1946)

9. Cliffton, E.E. and Grossi, C.E.: Fibrinolytic activity of human tumors as meatured by the fibrin-plate method. Cancer, V.8, Nr.6 (1955), 1146

10. Dastre, A.: Fibrinolyse dans le sang. Arch.de physiol.norm. et path. Par 5 (1893), 661

11. Denis, P.S.: Essai sur l'application de la chimie a l'étude physiologique du sang de l'homme, et à l'étude physiologico-pathologique, hygiénique et therapeutique des maladies de cette humeur. Paris: Bechet jue (1838), 366 pp

12. Deutsch, E.: Blutgerinnungsfaktoren. Fr.Denticke, Wien, 1955

13. Goodpasture, E.W.: Fibrinogen II. The astimatincation of liver and intestine in rapid regeneration of fibrinogen. Am.J.Physiol.33:70 (1914)

14. Green, I.R.: Note on the action of sodium chloride in dissolving fibrin. J.Physiolog.8:372 (1887).

15. Gremliza: Afibrinogenemia fulminans. New Istambul Contribution to Clinical Science 3:14 (1954)

16. Halse, Th.: Fibrinolyse. Editio Cantor, Aulendorf (Württemberg), 1948

17. Halse, Th.: Das fibrinolytische Potential. Enzymologie, Pathologie u.Klinik. I.Teil: Medizinische Nr.50, S.2044 (1958) II.Teil:Medizinische Nr.51, S.2102 (1958)

18. Hauschild, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie. VEB Georg Thieme Verlag, Leipzig (1958

19. Hedin, S.G.: I.) Investigations on the proteolytic enzymes of spleen of the ox. II.)On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the J.Physiolog. I.) 30 (1903), 155 II.)30 (1903), 195

20. Hildebrandt, H.: Weiteres über hydrolytische Fermente, deren Schicksal und Wirkungen, sowie über Fermentfestigkeit und Hemmung der Fermentationen im Organismus. Virchows Arch.f.Path.Anat.131, 5 (1893

21. Hörmann, G. und Lemtis, I.: Untersuchungen über den fetalen Plazentarkreislauf während der Nachgeburtsperiode. Zentralblatt f.Gyn.: 9, 76.Jahrg. (1954) S.329

22. Hunter, I.: Works of, Vol.1 edited by I.P.Palmer, 1835

23. Jühling, L. und Wöhlisch, E.: Über Fibrinogenolyse unter dem Einfluss hydrotroper Substanzen. Biochem.Z.298:312 (1938)

24. Jürgens, J. und Beller, F.K.: Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1959 S.239 ff, S.24 f

25. Kaulla, K.N.v. and Shettles, L.B.: Relationship between human seminal fluid and the fibrinolytic system. Proc.Soc.Exper.Biol.& Med. 83:692 (1953)

26. Kline, D.L.: The purification and cristallisation of plasminogen (profibrinolysin). J.biol.Chem.204 (1953), 949

27. Koller, F.: Fibrinolyse. Schweiz.Med.Wschr.44 (1960), 1233

28. Lassen, M.: Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method. Acta physiol.Scandinavica 27:371-376, 1953

29. De Lee, L.B.: A case of fatal hemorrhagic diathesis with premature detachment of the placenta. Amer.J.Obstetr.Gynec.44:785 (1901)

30. Lewis, I.H. and Ferguson, I.H.: A proteolytic enzyme system of blood. III. Activation of dog serum profibrinolysin by staphylokinase. Am.J.Physiol.166:594 (1951)

31. Lewis, I.H. and Ferguson, I.H.: Studies on a proteolytic enzyme system of the blood. IV. Activation of profibrinolysin by serum fibrinolyokinase. Proc.Soc.exper.biol.med.78 (1951,184

32. Liebermann, J.: Clinical syndromes associated with deficient lung fibrinolytic activity. I. A new concept of hyaline-membrane disease. The New England Journal of Medicine V.260, 619 (1959)

33. Liebermann, J.: Clinical syndromes associated with deficient fibrinolytic activity of the lung. II. Cystic fibrosis of the pancreas. Pediatrics, Vol.25, Nr.3, Part.I.: 419-431 (March 1960)

34. Loomis, E.C.: Fibrinolysin and antifibrinolysin. A proteolytic enzyme in blood. Blood clotting and allied problems. Trans. 5th Josiah Macy Ir.Conf. on Blood Clotting 1952, S.279 ff

35. Macfarlane, R.G. and Biggs, R.: Fibrinolysis. Its Mechanism and Significance. Blood 3 (1948), 1167

36. Mathey, Daumet, Le Bolloch et Fayet: Hemorrhagies graves au cours d'intervention thoraciques par incoagulabilité sanguine due à la fibrinolyse. Mém.Acad.chir., Paris, 76:977 (1950)

37. Morawitz, P.: Über einige postmortale Blutveränderungen. Beitr.z.chem.Phys.u.Path., Brnschwg. 8:1 (1906)

38. Morgagni, I.P.: De sedibus et causis morborum, per anatomen indagatis. Tomus secundus (1761)

39. Müllertz, S.: A plasminogen activator in spontaneously active human blood. Proc.Soc.exper.Biol. u.Med. 82 (1953), 291

40. Müllertz, S. and Lassen, M.: An activator system in blood indispensable for formation of plasmin by streptokinase. Proc.Soc.exper.Biol. u.Med. 82 (1953), 264

41. de Nicola, P.: Die Bedeutung der Fibrinolyse für die Entstehung hämorrhagischer Diathesen. Hämorrhag.Diathesen int.Symposion, Wien, 4./5.II.1955 Herausgeb.: R.Jürgens (Basel) u. E.Deutsch (Wien) Wien, Springer-Verlag, 1955

42. Nolf, P.: Des modifications de la coagulation du sang chez le chien aprés du foie. Arch.intern.de physiol. 3 (1905),1

43. Nolf, P.: Contribution à l'etude de la coagulation du sang (5e memoire). La fibrinolyse. Arch.intern.de physiol. 6. (1908), 306

44. Owren: The coagulation of blood. Oslo, 1949

45. Permin, P.M.: Properties of the fibrinokinase-fibrinolyse system.
Nature 160 (1947), 571

46. Permin, P.M.: Fibrinolytic activator in animal tissue.
Acta physiol.Scandinav.
21: 159-167, 1950

47. Ratnoff, O.D.: Studies on a proteolytic enzyme in human plasma.
II. Some factors influencing the enzymes activated by chloroform and by streptococcal fibrinolysin.
J.exper.Med. 87:211 (1948)

48. Ratnoff, O.D.: Studies on a proteolytic enzyme in human plasma.
III. Some factors controlling the rate of fibrinolysis.
J.exper.Med.88:401 (1948)

49. Ratnoff, O.D.: Studies on a proteolytic enzyme in human plasma.
IV. The rate of lysis of plasma clots in normal and disead individuals, with particular reference to hepatic disease.
Bull.Johns Hopkins Hosp.84:29(1949)

50. Ratnoff, O.D.: Studies on a proteolytic enzyme in human plasma.
VII. A fatal hemorrhagic state associated with excessiv plasma proteolytic activity in a patient undergoing surgery for carcinoma of the head of the pancreas.
J.clin.invest.5:521 (1952)

51. Rocha E Silva, M. and/Rimington, C.: Studies on the activation and purification of blood fibrinolysin.
Biochem.J. 43 (1948), 163

52. Rosenmann, M.: Über Fibrinolyse.
III.Mitteilung.
Biochem.Ztschr.129:101 (1922)

53. Rosenmann, M.: Über Fibrinolyse.
V.Mitteilung.
Biochem.Ztschr.287:26 (1936)

54. Rosenmann, M.: Über die Beziehung des Thrombolysins und Thrombolignins zur Blutgerinnung.
VI.Mitteilung über Fibrinolyse.
Biochem.Ztschr.290:213 (1937)

55. Rosolleck, H.: Grundlagen und klinische Bedeutung der Therapie mit Streptokinase und Streptodornase. Ärztl.Wschr.46:1018-1022 (1958)

56. Rulot, H.: Intervention des leucocytes dans l'autolyse de la fibrine (fibrinolyse de Dastre). Arch.intern.de physiol. 1 (1904), 152

57. Schulz, F.H. und Knobloch, H.: Über den klinischen Wert der Fibrinolysebestimmung bei Tumoren, Leukämien und Reticulosen. Münch.Med.Wschr.96:1534 (1954)

58. Sherry, S.; Fletscher, A.P. and Alkajersig, N.: Developments in fibrinolytic therapy for thrombo-embolic disease. Physiolog.Rev.39:343 (1959)

59. Stefanini, M.: Fibrinolysis and Fibrinolytic Purpura. Blood, V.VII, Nr.10 (1952), 1044

60. Tagnon, H.I. and Petermann, M.L.: Activation of proplasmin by a tissue fraction. Proc.Soc.exper.Biol.Med.70 (1949), 359

61. Tillet, S.W. and Garner, R.L.: The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. J.exp.Med.: 58, 485 (1933)

62. Weiner, A.E.; Reid, D.E. and Roby, C.C.: Coagulation defects associated with premature separation of the normally implanted placenta. Amer.J.Obstetr.Gynec.60:379 (1950)

63. Yamakawa, S.: The autodigestion of normal serum through the action of certain chemical agents. J.exper.Med.27 (1918), 689

Die Arbeit wurde durch die materielle Unterstützung von Seiten der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.
Herrn Prof.Dr.med.Karlferdinand KLOOS danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit.
Ferner möchte ich Herrn Prof.Dr.med.Herbert LAX (Leiter der Gynäkologisch-geburtshilflichen Klinik der Freien Universität am Städtischen Krankenhaus Moabit) für das freundlicher Weise zur Verfügung gestellte Material danken.
Die Cyanamid G.M.B.H. Lederle Arzneimittel in München hat uns durch die kostenlose Lieferung von Streptokinase-Streptodornase ("Varidase") unterstützt.

L e b e n s l a u f

Am 23.Juli 1932 wurde ich in Tausa (Thüringen) geboren.
Von 1939 bis 1947 besuchte ich die Volksschule.
In der Zeit vom 1.September 1947 bis 31.März 1950 erlernte ich das Elektrowerkerhandwerk; gleichzeitig besuchte ich die Berufsschule.
Nach Abschluss meiner handwerklichen Ausbildung trat ich am 5.September 1950 in die Vorstudienanstalt der "Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg" ein. Von dieser Ausbildungsstätte wechselte ich am 1.September 1952 an die "Abendoberschule für Erwachsene" in Dessau über. An dieser Schule legte ich am 7.Juli 1953 mein Abiturium ab.
Von Oktober 1952 bis August 1953 habe ich im Pathologischen Institut der Städtischen Krankenanstalten Dessau-Alten als Sektions- und Laborgehilfe gearbeitet.
Im Herbst 1953 wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig immatrikuliert. Im Dezember 1956 verzog ich von Leipzig nach West-Berlin und am 15.Januar 1957 wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin eingeschrieben; hier legte ich am 15.Februar 1960 das medizinische Staatsexamen ab.
Vom 15.April 1960 bis 15.August 1960 arbeitete ich als Medizinalassistent im Pathologischen Institut am Städtischen Krankenhaus Moabit. In diesem Institut habe ich die hier vorgelegte Arbeit durchgeführt.
Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent an der Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Leverkusen.